

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: YOUNG-A KIM, ET AL.)
)
FOR: METHOD OF REPLICATING NUCLEIC ACID)
ARRAY)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

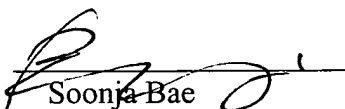
Dear Commissioner:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2003-0000381 filed on January 3, 2003. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicants hereby claim the benefit of the filing date of January 3, 2003, of the Korean Patent Application No. 2003-0000381, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By: 

Soonja Bae
Reg. No. (Please see attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
Telephone: (860) 286-2929
Fax: (860) 286-0115
PTO Customer No. 23413

Date: December 31, 2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0000381
Application Number PATENT-2003-0000381

출 원 년 월 일 : 2003년 01월 03일
Date of Application JAN 03, 2003

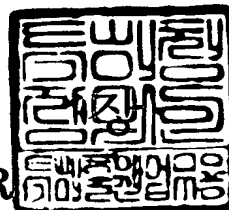
출 원 인 : 삼성전자 주식회사
Applicant(s) SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.



2003 년 01 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



41

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0002
【제출일자】	2003.01.03
【국제특허분류】	C12Q
【발명의 명칭】	핵산 어레이의 복제방법
【발명의 영문명칭】	Method for replicating nucleic acid array
【출원인】	
【명칭】	삼성전자 주식회사
【출원인코드】	1-1998-104271-3
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	1999-009556-9
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2000-002816-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영아
【성명의 영문표기】	KIM,Young A
【주민등록번호】	740825-2691619
【우편번호】	442-741
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을쌍용아파트 245동 1804호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임희균
【성명의 영문표기】	LIM,Hee Kyun
【주민등록번호】	750625-1047321

【우편번호】	405-826
【주소】	인천광역시 남동구 구월2동 70-90 21/8
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영환
【성명의 영문표기】	LEE, Young Hwan
【주민등록번호】	730303-1226141
【우편번호】	449-901
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 농서리 산14-1 삼성종합기술원
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임근배
【성명의 영문표기】	LIM, Geun Bae
【주민등록번호】	650323-1682919
【우편번호】	442-745
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을풍림아파트 232동 1205호
【국적】	KR
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 이영 필 (인) 대리인 이해영 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	1 면 1,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	30,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은

각각의 제 2 폴리뉴클레오티드(6)의 염기서열과 상보적인 제 1 폴리뉴클레오티드(2) 및 프라이머 결합부위(1)를 갖는 제 1 핵산 프로브를 제 1 기판(10)에 고정시켜 주형 핵산 어레이를 제조하는 단계;

상기 주형 핵산 어레이의 기질 표면에 고정된 각각의 제 1 핵산 프로브의 프라이머 결합부위(1)에 프라이머(4)를 결합시키는 단계;

상기 프라이머로부터 제 1 폴리뉴클레오티드(2)를 주형으로 하여 제 2 폴리뉴클레오티드(6)를 인-시투 합성하는 단계;

상기 합성된 복수개의 제 2 폴리뉴클레오티드(6) 및 프라이머(4)를 갖는 제 2 핵산 프로브를 제 2 기판(20)으로 전사시키는 단계를 포함하는 핵산 어레이의 복제방법을 제공한다.

【대표도】

도 1a

【명세서】**【발명의 명칭】**

핵산 어레이의 복제방법{Method for replicating nucleic acid array}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 본 발명의 핵산 어레이를 제조하기 위하여 우선 주형 핵산 어레이를 제작하는 단계를 나타낸 것이다.

도 1b는 제작된 주형 핵산 어레이의 기판에 고정된 각각의 제 1 핵산 프로브의 프라이머 결합부위에 프라이머(4)를 결합시키는 단계를 나타낸 것이다.

도 1c는 프라이머로부터 제 2 폴리뉴클레오티드(6)를 인-시투 합성시키는 단계를 나타낸 것이다.

도 1d는 합성된 제 2 폴리뉴클레오티드 및 프라이머를 갖는 제 2 핵산 프로브를 제 2 기판(20)에 전사시킴으로써 완성된 핵산 어레이를 나타낸 것이다.

도 2는 요철 구조를 갖도록 패터닝된 기판의 오목 부분에 제 1 핵산 프로브 용액을 채운 다음, 패터닝된 다른 기판의 볼록 부분과 접촉시킴으로써 제 1 핵산 프로브를 제 1 기판에 고정시키는 것을 나타낸 것이다.

도 3는 실시예 1에서 제 2 폴리뉴클레오티드를 인-시투 합성한 후의 유리 기판을 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔한 것이다.

도 4은 실시예 2에서 제 2 DNA 프로브를 혼성화 한 후의 유리 기판을 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔한 것이다.

도 5는 실시예 2에서 제 2 DNA 프로브가 옮겨진 후의 주형 핵산 어레이를 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔한 것이다.

도 6은 실시예 2에서 제 2 DNA 프로브를 전사시키고 세척하기 전의 알데히드 유리 기판을 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔한 것이다.

도 7은 실시예 2에서 제 2 DNA 프로브를 전사시키고 세척한 후의 알데히드 유리 기판을 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔한 것이다.

< 도면의 주요부분에 대한 설명 >

- 1 : 프라이머 결합부위
- 2 : 제 2 폴리뉴클레오타이드의 염기서열에 상보적인 제 1 폴리뉴클레오타이드
- 3 : 제 1 기판에 패터닝된 금속 또는 작용기
- 4 : 프라이머
- 5 : 제 2 기판과의 결합력이 강한 작용기
- 6 : 제 2 폴리뉴클레오타이드
- 7 : 제 1 핵산 프로브 용액
- 10 : 제 1 기판
- 20 : 제 2 기판

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <21> 본 발명은 핵산 어레이의 복제방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비-포토리쏘그래피(non-photolithography) 및 비-스팟팅(non-spotting) 방법으로 간단하게 핵산 어레이를 복제하는 방법에 관한 것이다.
- <22> 핵산 어레이는 생물질인 DNA 또는 RNA와, 반도체와 같은 무기물질을 결합시켜 반도체 칩 형태로 만들어진 하이브리드 소자(hybrid device) 이다.
- <23> 핵산 어레이는 종래의 시퀀싱(sequencing)등의 방법과 비교하여 대량의 핵산 정보를 동시에 얻을 수 있다는 장점으로 인하여 현재 큰 각광을 받고 있다. 핵산 어레이를 제조하는데 있어서 중요한 점 중의 하나는 마이크로미터 스케일의 제한된 영역에 생물질, 즉 핵산을 고도로 집적시켜야 한다는 것이다. 그 이유는 고집적 핵산 어레이가 핵산 정보를 디코딩하는 능력이 높기 때문이다. 따라서, 현재 백만개의 프로브를 가진 핵산 어레이도 제조되고 있다.
- <24> 핵산 어레이를 제조하는 방법으로는 여러 가지가 있는데, 크게 칩 기판 상에서 올리고뉴클레오타이드 또는 cDNA를 직접 합성함으로써 프로브를 인-시투(in-situ)로 형성하는 방법과 미리 합성한 올리고뉴클레오타이드 또는 cDNA를 스팟팅(spotting) 등의 방법으로 기판 위에 위치시키는 방법이 있다.
- <25> 인-시투 합성방법은 포토리쏘그래피(photolithography) 방법을 이용하는데, 기판 위에서 직접 반응을 시키므로 잘못된 DNA 또는 RNA가 나오게 되더라도 이를 수정할 방법

이 없으며, 아데닌, 시토신 구아닌, 티민 4종류의 염기를 한층 쌓기 위해서는 4장의 마스크가 필요하고 각 단계마다 용액을 갈아주고 세척하는 작업이 요구되고 이에 따라 핵산 어레이를 만드는데 소요되는 시간과 비용은 프로브의 길이에 비례하여 증가하게 된다.

<26> 스폿팅 방법의 경우 미리 합성한 DNA 또는 RNA를 정제하여 사용하므로 DNA 또는 RNA가 잘못 합성되어 생기는 오류는 미리 예방할 수 있지만 고밀도 핵산 어레이를 제조하기 위해서는 한 종류의 핵산 프로브마다 순차적으로 스폿팅 하는 과정이 필요하므로 프로브의 종류가 증가함에 따라 핵산 어레이를 제조하기 위해 소요되는 시간이 선형적으로 증가하게 된다. 따라서, 이들 방법은 핵산 어레이의 대량생산에 적용되기가 어렵다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<27> 본 발명은 프로브의 길이 또는 프로브의 종류가 증가하더라도 비용과 시간이 크게 증가되지 않으며, 대량생산이 가능한 핵산 어레이의 복제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<28> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은

<29> 각각의 제 2 폴리뉴클레오티드(6)의 염기서열과 상보적인 제 1 폴리뉴클레오티드(2) 및 프라이머 결합부위(1)를 갖는 제 1 핵산 프로브를 제 1 기판(10)에 고정시켜 주형 핵산 어레이를 제조하는 단계;

- <30> 상기 주형 핵산 어레이의 기질 표면에 고정된 각각의 제 1 핵산 프로브의 프라이머 결합부위(1)에 프라이머(4)를 결합시키는 단계;
- <31> 상기 프라이머로부터 제 1 폴리뉴클레오티드(2)를 주형으로 하여 제 2 폴리뉴클레오티드(6)를 인-시투(in-situ) 합성하는 단계;
- <32> 상기 합성된 복수개의 제 2 폴리뉴클레오티드(6) 및 프라이머(4)를 갖는 제 2 핵산 프로브를 제 2 기판(20)으로 전사(transfer)시키는 단계를 포함하는 핵산 어레이의 제조방법을 제공한다.
- <33> 상기 주형 핵산 어레이를 제조하는 단계에서, 핵산 프로브를 상기 제 1 기판에 고정시키기 이전에 상기 제 1 기판을 패터닝 또는 표면처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- <34> 제 1 기판의 패터닝은 상기 제 1 기판 상에 금속막 패턴을 형성함으로써 이루어질 수 있다. 상기 금속 막은 금, 백금, 또는 은으로 이루어지는 것이 바람직하다.
- <35> 제 1 기판의 표면처리는 상기 제 1 핵산 프로브 말단과 결합 가능하도록 제 1 기판 표면에 작용기 또는 물질을 부착시킴으로써 이루어 질 수 있다. 부착되는 작용기 또는 물질로는 알데히드기, 스트렙타비딘 등이 있는데, 이들로만 제한되는 것은 아니며, 핵산 프로브 말단과 특이적으로 결합 가능한 것이라면 어느 것이라도 무방하다.
- <36> 또한, 상기 주형 핵산 어레이는 요철 구조를 갖도록 패터닝된 다른 기판에서 오목 부분에 제 1 핵산 프로브 용액을 채운 다음, 패터닝된 제 1 기판의 볼록 부분과 접촉시킴으로써 제조할 수도 있다(도 2).

- <37> 상기 프라이머를 결합시키는 단계에서, 상기 프라이머는 유니버설 프라이머가 바람직하다. 또한 상기 프라이머는 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 중복되는 염기서열을 포함하지 않는 것이 바람직하다.
- <38> 또한, 프라이머 일단에는 상기 제 2 기판의 표면과 결합할 수 있는 작용기 또는 물질을 부착시킬 수 있다.
- <39> 상기 전사 단계 이전에 상기 제 1 폴리뉴클레오티드와 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 하이브리드의 수소결합을 끊어주는 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 하이브리드를 T_m 이상의 온도에서 열처리하거나, pH를 높인다든지, 포름 알데히드 등의 유기화합물을 첨가하는 등의 공지의 방법으로 수소결합을 끊어줄 수 있다.
- <40> 제 2 폴리뉴클레오티드를 상기 제 2 기판에 고정시키기 이전에 제 2 기판을 패터닝하거나 표면처리하는 단계를 더 포함할 수도 있다. 제 2 기판의 패터닝 또는 표면처리는 제 1 기판의 경우와 같은 방법으로 이루어 질 수 있다.
- <41> 또한, 본 발명에서는 상기에서 일단 제조된 주형 핵산 어레이를 반복적으로 이용함으로써 합성된 상기 제 2 폴리뉴클레오티드를 새로운 기판에 전사시킴으로써 핵산 어레이를 대량으로 제조할 수 있다.
- <42> 이하 도 1a 내지 도 1d를 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <43> 도 1a 내지 도 1d는 본 발명에 따른 핵산 어레이의 제조방법을 단계적으로 도식화한 것이다.
- <44> 도 1a는 본 발명의 핵산 어레이를 제조하기 위하여 우선 주형 핵산 어레이를 제작하는 단계를 나타낸다.

- <45> 주형 핵산 어레이를 제작하기 위해, 제 2 폴리뉴클레오티드의 염기서열에 상보적인 제 1 폴리뉴클레오티드(2) 및 프라이머 결합부위(1)를 갖는 제 1 핵산 프로브를 제작하여 제 1 기판(10)의 표면에 고정시킨다.
- <46> 제 1 핵산 프로브와 제 1 기판 표면과의 특이적 결합을 위해 제 1 기판은 패터닝 또는 표면처리되어 있는 것이 바람직하다.
- <47> 제 1 기판의 패터닝은 상기 제 1 기판 상에 금속막 패턴(3)을 형성함으로써, 제 1 기판의 표면처리는 상기 제 1 핵산 프로브 말단과 결합 가능하도록 제 1 기판 표면에 작용기 또는 물질을 부착시킴으로써 이루어 질 수 있다.
- <48> 상기 금속막 패턴은 금, 백금, 은, 또는 이들의 조합 등을 이용하여, 일반적인 포토리소그래피 방법에 의해 형성될 수 있다. 구체적으로는, 기판상에 금속막을 형성하고, 그 위에 포토리지스트막을 형성한다. 마스크를 이용하여 노광한 후, 포토리지스트막 패턴을 형성하고, 그 패턴을 이용하여 금속막을 식각함으로써 원하는 금속막 패턴을 형성한다.
- <49> 상기 제 1 핵산 프로브의 제 1 폴리뉴클레오티드의 말단에도 제 1 기판과의 특이적 결합을 위해 작용기 또는 물질을 부착시킨다. 예를 들어, 백금이 패턴된 기판을 사용할 경우에는 티올기, 금이 패턴된 기판을 사용할 경우에는 티올기, 알데히드기가 표면처리된 기판일 경우는 아미노기, 스테렙타비딘이 표면처리된 기판일 경우에는 비오틴을 작용기 또는 물질로서 상기 제 1 핵산 프로브 말단의 제 1 폴리뉴클레오티드 말단에 결합시킨다.

- <50> 또한, 상기 제 1 핵산 프로브를 도 2에 나타낸 바와 같이, 요철 구조를 갖도록 패터닝된 다른 기판에서 오목 부분에 제 1 핵산 프로브 용액을 채운 다음, 패터닝된 제 1 기판의 볼록 부분과 접촉시킴으로써 제 1 핵산 프로브를 제 1 기판의 표면에 부착시킬 수도 있다.
- <51> 제 1 기판 중 제 1 핵산 프로브가 고정되는 부분이 볼록하게 튀어나온 3차원 구조의 기판을 사용하면, 하나의 핵산 프로브 용액이 다른 핵산 프로브와 섞이는 것을 방지하는 한편, 핵산 프로브의 수가 많은 경우에도 핵산 프로브를 간편하게 고정시킬 수 있는 이점이 있다.
- <52> 상기 제 1 핵산 프로브는 예를 들어 SAM(Self-Assembled-Monolayer) 방법을 이용하여 고체기판에 균일하게 고정될 수 있다.
- <53> 도 1b는 상기 제작된 주형 핵산 어레이의 기판에 고정된 각각의 제 1 핵산 프로브의 프라이머 결합부위(1)에 프라이머(4)를 결합시키는 단계를 나타낸다.
- <54> 상기 프라이머는 유니버설 프라이머(핵산 프로브 각각의 다양한 염기서열에 무관하게 동일한 염기서열을 갖는 한 종류의 프라이머)인 것이 바람직하다. 이에 대응하여 상기 고체 기판에 고정되는 모든 핵산 프로브의 프라이머 결합부위가 유니버설 프라이머와 혼성화되도록 유니버설 프라이머에 상보적인 것이 바람직하다.
- <55> 동일한 유니버설 프라이머를 사용하면 동일한 온도조건에서 서열이 서로 다른 핵산 프로브에 유니버설 프라이머가 동시에 결합할 수 있어 온도조절이 용이하고 프라이머가 각각의 제 1 핵산 프로브에 결합되는 정도의 차이를 줄일 수 있게 되어, 이후에 최종 핵

산 어레이의 스팟마다 생성되는 제 2 폴리뉴클레오티드 양의 균일성을 높일 수 있게 된다.

<56> 또한, 상기 프라이머는 상기 프라이머 결합부위와의 특이적 결합을 위해 제 2 폴리뉴클레오티드의 염기서열과 중복되는 부분이 포함되지 않는 것이 바람직하다.

<57> 상기 프라이머의 말단에는 제 2 기판(20)의 표면과의 결합을 용이하게 하는 작용기 또는 물질(5)을 부착시키는 것이 바람직하다.

<58> 도 1c는 상기 프라이머로부터 제 2 폴리뉴클레오티드(6)를 인-시투 합성시키는 단계를 나타낸다.

<59> 핵산 폴리머라제, Taq 폴리머라제, 또는 써모시퀀나제(thermosequenase) 등의 핵산 염기를 연장시킬 수 있는 효소, 프라이머, dNTP를 함께 혼합한 용액을 준비한다. 합성하고자 하는 핵산의 길이가 18mers 이하인 경우에는 써모시퀀나제를 사용하는 것이 바람직하고, 18mers가 초과될 경우에는 Taq 폴리머라제를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 혼합용액에 상기 제조된 주형 핵산 어레이를 담그면 주형 핵산 어레이의 각각 핵산 프로브에 유니버설 프라이머의 혼성화와 함께 완전하게 상보적인 제 2 폴리뉴클레오티드가 합성될 수 있으며, 제 2 폴리뉴클레오티드는 적절한 온도 조건에서 제 1 핵산 프로브에 결합된 상태를 유지한다.

<60> 도 1d는 상기 합성된 제 2 폴리뉴클레오티드(6) 및 프라이머(4)를 갖는 제 2 핵산 프로브를 제 2 기판(20)에 전사시킴으로써 완성된 핵산 어레이를 나타낸다.

<61> 상기 주형 핵산 어레이의 제 1 핵산 프로브와 제 2 핵산 프로브의 하이브리드의 수소결합을 파괴시킨다. 수소결합의 파괴방법으로서 예를 들어, T_m 이상의 온도로 처리한

다. 프로브로부터 분리된 제 2 핵산 프로브를 새로운 기판인 제 2 기판(20)에 옮겨 고정시킨다.

<62> 제 2 핵산 프로브를 상기 제 2 기판에 고정시키기 이전에 제 2 기판이 제 2 핵산 프로브와 특이적으로 결합 가능하도록 하기 위해 제 2 기판은 패터닝 또는 표면처리되어 있는 것이 바람직하다. 패터닝 또는 표면처리 방법은 제 1 기판의 경우와 동일하다.

<63> 제 2 폴리뉴클레오티드가 제 2 기판에 전사된 것이 최종적으로 제조하고자 하는 핵산 어레이다.

<64> 상기 제조한 주형 핵산 어레이를 반복적으로 이용하여 상기 제 2 폴리뉴클레오티드를 제 2 기판에 전사시킴으로써 핵산 어레이를 계속해서 반복적으로 제조할 수 있다.

<65> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<66> 실시예 1

<67> 고체 기판 상에서 제 2 폴리뉴클레오티드의 인-시투 합성

<68> A. DNA 프로브의 고정화

<69> 아미노기가 결합된 DNA 프로브(5'-AGCGTCCTGTTGGTGCTACTACTCTTCTTG-3'-NH₂)를 1X Micro-Spotting Solution Plus (TeleChem사)에 녹였다. 아미노기가 결합된 DNA 프로브를 마이크로피펫을 사용하여 수퍼알데히드-코팅 슬라이드 글래스(Telechem사) 위에 스팟팅 하였다. 스팟팅된 슬라이드 글래스를 실온(약 25℃)에서 12시간동안 방치하여 건조시켰다. 그리고 나서, 고정되지 않은 DNA를 제거하기 위해 슬라이드 글래스를 상온에서

0.2% SDS 용액으로 세게 흔들어 주면서 2분간 두 차례 세척하였다. 동일한 방법으로 슬라이드 글래스를 증류수로 두 번 세척하였다.

<70> B. 표적 DNA의 인-시투 합성

<71> 상기 A 과정에서 제조된 슬라이드 글래스와 혼성화 장치(DNA solution)를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 인-시투 합성 방법을 실시하였다. 씨모시퀀나제 1.8ul(32 유닛), 10x 효소 완충용액(750mM Tris-HCl (pH9.0), 150mM (NH₄)₂SO₄, 25mM MgCl₂, 1mg/ml BSA) 10ul, dNTPs 200uM (dUTP는 Cy3-라벨된 것을 사용하였다), MgCl₂ 0.5mM, 말단에 비오틴을 미리 결합시킨 유니버설 프라이머(비오틴-5'-caagaagagtagtag-3') 25uM, 증류수를 첨가하여 100ul의 반응 혼합물을 제조한 것을 DNA 용액으로 사용하였다.

<72> 인-시투 합성과정을 거치면 DNA 프라이머에 15mers 길이만큼 새로운 DNA가 합성되게 되는데 가장 말단에 유일하게 존재하는 염기인 아데닌에 상보적인 Cy3-dUTP의 존재유무를 형광 스캐너(GSI Lumonics)를 이용하여 확인함으로써 15mers가 모두 합성되었는지 여부를 확인하였다. 형광 스캔 사진은 도 2에 나타내었다. 도 3는 한 칩에 16개의 동일한 DNA 프로브를 고정화시켜 인-시투 합성한 결과를 나타내는데, 스팟의 형광 시그널이 나타나므로, 인-시투 합성을 확인할 수 있었다.

<73> C. 표적 DNA의 제 2 기판 표면으로의 전사

<74> 혼성화된 유리기판에 1 X Micro-Spotting Solution Plus (TeleChem) 용액을 첨가하고 제 2 기판인 새로운 스트렙타비딘 코팅된 제 2기판을 포개어 놓았다. 스트렙타비딘과 비오틴 결합이 생성될 수 있도록 상온에서 30분간 방치한 후, 70℃의

오븐에서 1 시간 동안 유지하여 제 1 DNA 프로브와 제 2 DNA 프로브 간의 수소 결합을 끊어주었다. 제 1 DNA 프로브가 고정되어 있는 글래스와 제 2 DNA 프로브가 옮겨져 고정된 새로운 스트렙타비딘 코팅된 제 2기판을 떼어내서 0.2% SDS 용액에서 세척하여 건조시켰다. 이런 과정을 거쳐서 제 2 DNA 프로브만을 제 2 기판에 옮겨 심게 되었다.

<75> 실시예 2

<76> 표적 DNA의 제 2 기판 표면으로의 전사 및 고정화

<77> A. 백금 패터닝된 글래스의 세척

<78> 먼저 백금이 패터닝된 글래스(Au pattern : 2 X 2 mm)를 $H_2SO_4 : H_2O_2 = 3 : 1$ 용액에서 90℃ 온도를 유지하면서 10분간 세척하였다. 세척 후 다시 3차 증류수로 세척하고 질소로 건조시켰다.

<79> B. DNA 프로브의 고정

<80> 건조된 백금이 패터닝된 글래스를 2.5 μ M 농도의 DNA 프로브

(5'-HS-GTTCTTCTCATCATC-3') 용액(TE 완충용액, pH 7.4)에 담그어 3 내지 5시간 동안 상온에서 SAM(self assembled monolayer) 반응을 시켰다. 반응 후 3차 증류수로 세척하여 미반응 프로브를 제거하였다.

<81> C. 표적 DNA 혼성화

<82> DNA 프로브에 상보적인 염기서열을 가지며 한쪽 말단에 아미노기를 갖고 다른 쪽 말단에는 FITC가 결합된 표적 DNA의 용액(3'-NH₂-CAAGAAGAGATAGTAG-FITC-5' 2 μ M, 1M NaCl 첨가된 TE buffer, pH 7.4)을 만들어 2시간 동안 혼성화 반응을 시켰다. 혼성화 후 2X SSC(2% SDS첨가) 용액으로 세척하여 반응하지 않고 남아있는 과량의 표적 DNA를

제거하였다. 형광 스캐너(GSI Lumonics)를 이용하여 혼성화 여부를 확인하였다(도 4). 도 4는 패턴된 18개 백금 위에 고정화된 동일한 DNA 프로브의 표적 DNA 혼성화 여부를 나타내는데, FITC에 의한 형광 시그널이 나타나므로, 표적 DNA의 혼성화를 확인할 수 있었다.

<83> D. 표적 DNA의 제 2 기판 표면으로의 전사

<84> 혼성화된 백금 패턴 글래스에 1% NaBH₃CN이 첨가된 1 X Micro-Spotting Solution Plus (TeleChem) 용액을 첨가하고 제 2 기판인 새로운 알데히드 글래스를 포개어 놓았다. CH₂-NH 결합이 생성될 수 있도록 상온에서 2시간 방치한 후, 80℃의 오븐에서 1 시간 동안 유지하여 제 1 DNA 프로브와 제 2 DNA 프로브 간의 수소 결합을 끊어주었다. 제 1 DNA 프로브가 고정되어 있는 백금 패턴된 글래스와 제 2 DNA 프로브가 옮겨져 고정된 새로운 알데히드 글래스를 떼어내서 0.2% SDS 용액에서 세척하여 건조시켰다. 제 1 DNA 프로브가 옮겨진 후의 백금 패턴 글래스(도 5), 제 2 DNA 프로브를 옮겨 고정시키고 세척하기 전의 알데히드 글래스(도 6), 제 2 DNA 프로브를 옮겨 고정시키고 세척한 후의 알데히드 글래스(도 7)를 각각 형광 스캐너(GSI Lumonics)로 스캔하여 표적 DNA에 미리 결합시킨 FITC를 검출함으로써 글래스에 부착된 제 2 DNA 프로브의 양을 확인하였다.

【발명의 효과】

<85> 본 발명에 따르면, 하나의 핵산 어레이 자체를 주형으로 하여 인-시투 합성된 제 2 폴리뉴클레오티드 전체를 새로운 기판에 옮겨 고정하는 방법을 취함으로써 핵산 어레이 상의 프로브의 종류나 길이가 증가하더라도 이에 따라 소요되는 비용이나 시간은 기

존의 방법에 비해 크게 줄어들므로, 앞서 언급한 포토리쓰그래피 방법과 스폿팅 방법이 가진 문제점을 해결할 수 있다.

<86> 또한, 유니버설 프라이머를 사용하는 경우에는 각 핵산 프로브마다 생성되는 제 2 폴리뉴클레오티드의 양을 동일하게 만들어, 최종적으로 제조되는 핵산 어레이의 핵산 스폿의 균일성이 보장될 수 있다.

<87> 더욱이, 본 발명에서는 주형 핵산 어레이를 일단 제작하면 이를 이용하여 계속해서 반복적으로 이에 상보적인 핵산 어레이를 제조할 수 있으므로 대량생산에 보다 용이하다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

i) 각각의 제 2 폴리뉴클레오티드(6)의 염기서열과 상보적인 제 1 폴리뉴클레오티드(2) 및 프라이머 결합부위(1)를 갖는 제 1 핵산 프로브를 제 1 기판(10)에 고정시켜 주형 핵산 어레이를 제조하는 단계;

ii) 상기 주형 핵산 어레이의 기질 표면에 고정된 각각의 제 1 핵산 프로브의 프라이머 결합부위(1)에 프라이머(4)를 결합시키는 단계;

iii) 상기 프라이머로부터 제 1 폴리뉴클레오티드(2)를 주형으로 하여 제 2 폴리뉴클레오티드(6)를 인-시투 합성하는 단계;

iv) 상기 합성된 복수개의 제 2 폴리뉴클레오티드(6) 및 프라이머(4)를 갖는 제 2 핵산 프로브를 제 2 기판(20)으로 전사시키는 단계를 포함하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 기판 및 제 2 기판은 패터닝 또는 표면처리되어 있는 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 패터닝은 금속막 패턴(3)이고, 표면처리는 기판에 고정화시킬 핵산의 말단과 결합 가능한 작용기 또는 물질(3)을 부착시키는 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 작용기 또는 물질은 알데히드, 스트렙타비딘, 또는 티올인 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 프라이머가 유니버설 프라이머인 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 프라이머 일단에 상기 제 2 기판의 표면과 결합할 수 있는 작용기 또는 물질(5)을 부착시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 7】

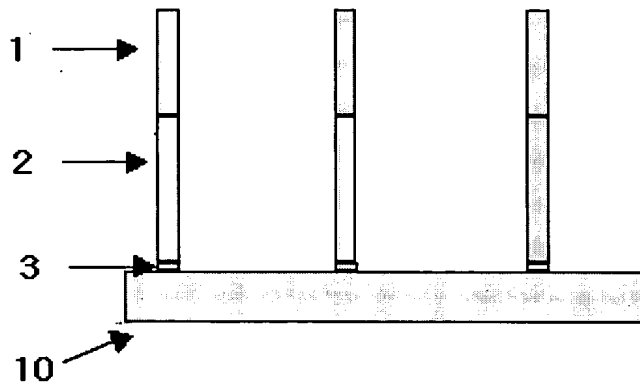
제 1 항에 있어서, 상기 전사 단계 이전에 상기 제 1 폴리뉴클레오티드와 상기 제 2 폴리뉴클레오티드의 하이브리드의 수소결합을 끊어주는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【청구항 8】

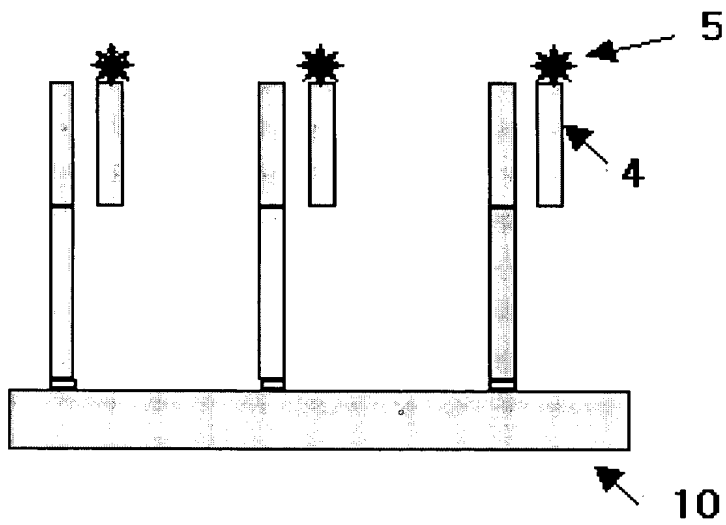
제 1 항에 있어서, 상기 주형 핵산 어레이로 ii)~iv)단계를 반복함으로써, 핵산 어레이를 대량으로 제조하는 것을 특징으로 하는 핵산 어레이의 복제방법.

【도면】

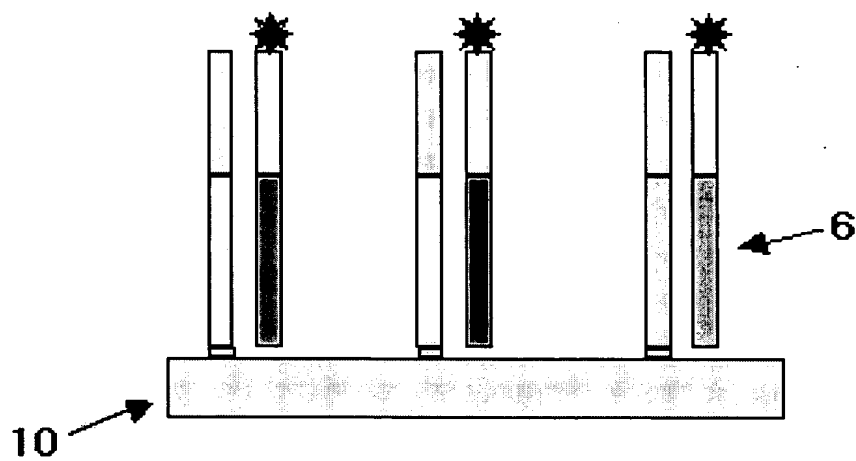
【도 1a】



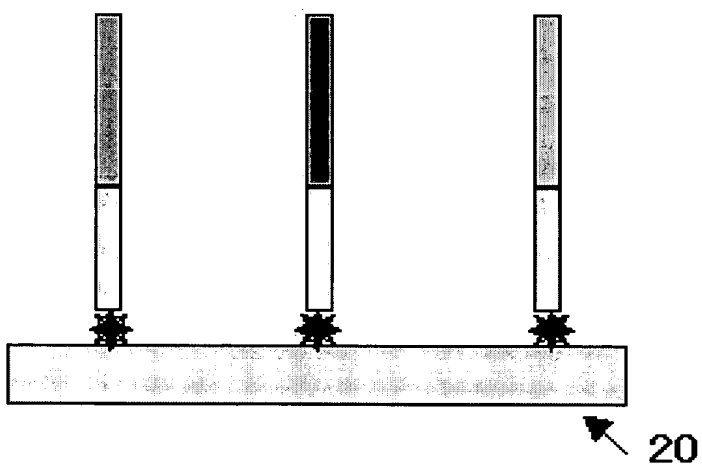
【도 1b】



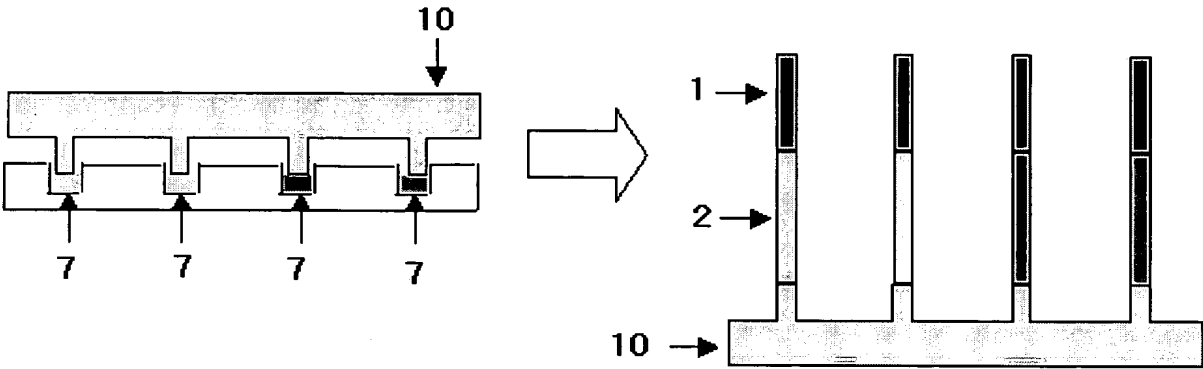
【도 1c】



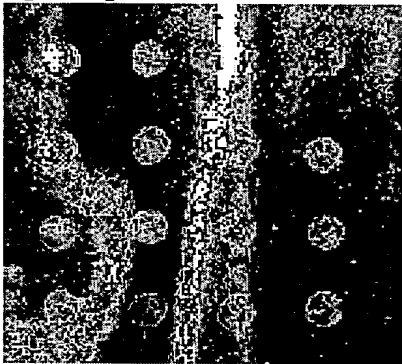
【도 1d】



【도 2】



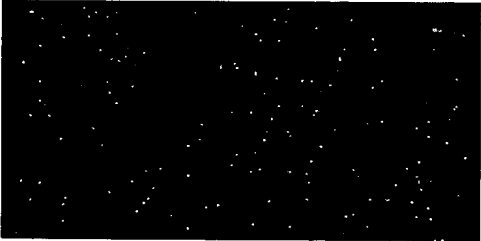
【도 3】



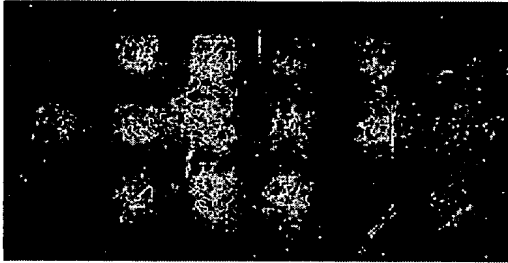
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

